

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

102

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication:

0 457 950 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 90109883.0

(51) Int. Cl.⁵: **A61K 31/20**

(22) Date de dépôt: 23.05.90

(43) Date de publication de la demande:
27.11.91 Bulletin 91/48

(84) États contractants désignés:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE
S.A.
Case postale 353
CH-1800 Vevey(CH)

(72) Inventeur: Guichardant, Michel
32, Bd de la Forêt
CH-1009 Pully(CH)
Inventeur: Rigaud, Michel
5, rue Bizet
F-87000 Limoges(FR)

(54) Utilisation de l'acide stéaridonique pour le traitement des maladies inflammatoires.

(57) On utilise l'acide stéaridonique dans une composition pharmaceutique dans le but de prévenir et de traiter les maladies d'origine inflammatoire chez les mammifères.

Le rôle de l'acide stéaridonique est d'inhiber la biosynthèse des leucotriènes et des acides hydroxyeicosatétraénoïques formés par l'action de la 5-lipoxygénase sur l'acide arachidonique.

EP 0 457 950 A1

L'invention a trait à l'utilisation de l'acide stéaridonique dans une composition pharmaceutique anti-inflammatoire.

L'acide stéaridonique (SA, C18:4 Δ 6,9,12,15) est un acide gras polyinsaturé, de la série n-3 (nomenclature définie par l'emplacement de la première double liaison à partir du groupe méthyl). Pour être
5 utilisé par l'organisme, l'acide alpha-linolénique (ALA, C 18:3 Δ 9,12,15), qui constitue le point de départ de la série n-3 et qui est présent dans la plupart des diètes ingérées, doit être métabolisé en SA par désaturation au moyen de l'enzyme Δ 6 désaturase. Or on sait que l'activité de cette enzyme est faible et qu'elle diminue lors du vieillissement et à la suite de certaines maladies.

Parmi les substances jouant un rôle important dans les processus inflammatoires, par exemple de type
10 allergiques tels que l'asthme, de type cutané comme l'acné, le psoriasis et l'eczéma, ou de type rhumatismal, ainsi que ceux consécutifs aux traumatismes, états de choc ou pathologies comme par exemple la mucoviscidose, les leucotriènes sont formés principalement par l'oxydation par les lipoxygénases de l'acide arachidonique (AA, C20:4 Δ 5,8,11,14) libéré à partir des membranes cellulaires. On sait en particulier que les leucocytes polymorphonucléés humains transforment l'AA en leucotriènes, particulière-
15 ment en acide (5S,12R)-5,12-dihydroxy-6,14-cis-8,10-trans-eicosatétraénoïque (LTB4) de forme stable par l'intermédiaire de la 5-lipoxigénase. Le LTB4 joue un rôle prédominant dans différents processus inflammatoires.

Pour cette raison, on tente de diminuer les facteurs de l'inflammation en développant des inhibiteurs de la 5-lipoxigénase. On a montré que certains acides gras supérieurs de la série n-3, par exemple selon Lee,
20 T.H. et al, (1984) dans J. Clin. Invest 74, 1922-1933, que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 Δ 5,8,11,14,17) pouvait moduler la synthèse des leucotriènes et améliorer les états inflammatoires. Ceci a été également montré pour un acide gras de la série n-6, l'acide dihomogamma-linolénique (DHLA, C20:3 Δ 8,11,14), par exemple selon Tate, G. et al., (1989) J. Rheumatol. 16,729-733. Nous avons trouvé que le SA a la propriété d'inhiber la biosynthèse des leucotriènes.

L'invention concerne donc l'utilisation de l'acide stéaridonique ou de l'un de ses dérivés pharmaceutique-
25 ment acceptable pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention et au traitement des maladies d'origine inflammatoire chez les mammifères, notamment les maladies allergiques, cutanées, rhumatismales et celles consécutives aux traumatismes, états de choc et pathologies.

Par dérivé pharmaceutiquement acceptable, on entend un sel, ester, ou amide correspondant à l'acide
30 gras. Comme sel on préfère les sels d'acides aminés, par exemple d'arginine. Les esters préférés envisagés sont par exemple les mono-, di- ou triglycérides et les phospholipides.

Dans un mode de réalisation particulier, on utilise le SA en combinaison avec un ou des acide(s) gras polyinsaturé(s) inhibiteur(s) du métabolisme oxygéné de l'AA. Ce peut être un acide gras polyinsaturé inhibiteur de la 5-lipoxigénase de la série n-3, par exemple l'EPA, l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6
35 Δ 4,7,10,13,16,19) ou de la série n-6, par exemple le DHLA ou son précurseur l'acide gamma-linolénique (GLA, C18:3 Δ 6,9,12), ou encore un dérivé pharmaceutiquement acceptable d'un tel acide gras tel que défini ci-dessus. Dans une mode de réalisation préféré de cette utilisation combinée, on met en oeuvre un concentrat contenant essentiellement le GLA et le SA provenant de l'huile de pépins de cassis, par exemple préparé selon l'exemple 1.2 de la demande de brevet CH 1919/89-9 (EP.A ...).

Dans un autre mode de réalisation préféré de cette utilisation combinée, on met en oeuvre un
40 concentrat contenant essentiellement le SA, l'EPA et le DHA provenant de l'huile de poisson, par exemple préparé selon le 1er par. de l'exemple 3 de la demande de brevet CH 1919/89-9 (EP.A ..).

Le SA ou le mélange d'acides gras polyinsaturés ou leurs dérivés utilisés peuvent être avantageusement protégés de l'oxydation par un antioxydant, par exemple le palmitate d'ascorbyle, les tocophérols, l'acide
45 ascorbique en présence de lécithine ou un mélange de tels antioxydants.

Une composition pharmaceutique précédente peut se présenter sous différentes formes adaptées au mode d'administration, par exemple par voie orale, entérale, rectale, parentérale ou topique.

On peut par exemple préparer des capsules, gélules, suppositoires ou sirops.

Dans le cas d'une administration entérale ou parentérale, la composition se présente sous forme de
50 solutions ou émulsions stabilisées chimiquement et physiquement, apyrogènes et stériles.

Dans le cas particulier d'une application topique, par exemple pour combattre les inflammations dermatologiques du type acné, eczéma ou psoriasis, la composition peut se présenter par exemple sous forme de pommade, onguent, crème ou lotion.

La dose administrée dépend du type et du degré de la maladie à traiter. Elle peut être de 0,05 à 10 g
55 d'acide stéaridonique par jour en prise unique ou de préférence en 2 à 3 prises séparées.

Les exemples ci-après illustrent l'invention. Dans ces exemples, les parties et pourcentages sont pondéraux sauf indication contraire.

Exemple 1Action du SA sur la biosynthèse des leucotriènes

5 Pour étudier l'action du SA sur la biosynthèse des leucotriènes, on incube des leucocytes humains isolés avec le SA et, à titre de comparaison avec l'EPA et le DHLA, on identifie les métabolites résultant de l'action de la 5-lipoxygénase sur l'AA par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (TLC) et on analyse quantitativement par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

10 Pour suivre les métabolismes de AA et SA, certaines expériences ont été faites avec ces acides gras marqués au C14 en position C1.

1. Conditions expérimentales1.1 Préparation des suspensions de cellules

15 On recueille du sang sur un mélange d'acide citrique, de citrate trisodique et de dextrose comme agent anti-coagulant à partir de donneurs normaux n'ayant pas pris de médicament pendant au moins 10 jours avant la prise de sang. Après centrifugation à 200 g pendant 15 min, on élimine le plasma riche en plaquettes et on recueille la fraction sanguine restante à laquelle on ajoute 0,5 volume d'une solution aqueuse contenant 3% de dextrane 250 et 0,9% de NaCl. On laisse les globules rouges sédimenter en environ 90 min à la température ambiante, puis on recueille le surnageant et on le centrifuge pendant 15 min à 80 g. On remet en suspension pendant 15 s ce sédiment obtenu correspondant à environ 2×10^6 cellules dans 1 ml d'eau distillée, puis on rétablit l'iso-osmolarité en ajoutant 1 ml de solution Tyrode/HEPES de concentration double. On centrifuge alors la suspension pendant 10 min. à 60 g, on recueille un sédiment de leucocytes, que l'on remet en suspension dans une solution Tyrode/HEPES contenant 2 mM (mmol/l) de calcium.

Après avoir stimulé les leucocytes par du calcium ionophore A23187 ($1 \mu\text{M}$) de l'AA ($20 \mu\text{M}$) pendant 10 min. à 37°C , on les incube avec les acides gras (le cas échéant marqué au C14 en position 1 pour SA ou AA) dans les quantités indiquées ci-après au par. 2. pendant 30 min. à 37°C . On arrête l'incubation au moyen d'éthanol contenant 2 nanomoles d'acide 13-hydroxy-octadécatriénoïque (13-HODE) (obtenu par action de la lipoxygénase de soja sur l'acide linoléique) et 2 nanomoles de prostaglandine B2 (PGB2), à raison de 3 fois le volume d'éthanol par rapport au volume de la suspension.

On extrait les lipides par le chloroforme à raison de 6 fois le volume de la suspension (sans l'éthanol). 13-HODE et PGB2 sont utilisés comme standards pour l'analyse quantitative.

35

1.2 Analyse des acides gras mono-hydroxylés

On sépare les lipides extraits sur des plaques de silicagel G par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince. On développe les acides gras monohydroxylés dans la première dimension au moyen d'un mélange solvant hexane/diéthyl-éther/acide acétique glacial en proportion volumique 59/40/1, les acides gras di-hydroxylés restant à l'origine de la plaque. On détecte, le cas échéant, les acides gras monohydroxylés marqués avec un détecteur de radioactivité, on les récolte de la plaque ainsi que le 13-HODE, on les extrait avec le diéthyl-éther, on évapore le solvant sous azote, puis on les sépare par HPLC en phase inverse avec un mélange solvant d'élution méthanol/acide acétique aqueux de pH3 en proportion volumique 73/27. On les détecte par spectroscopie UV à la longueur d'onde 234 nm et on les quantifie par comparaison avec le standard 13-HODE en faisant l'hypothèse qu'ils ont tous la même extinction spécifique $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

1.3. Analyse des acides gras di-hydroxylés

50

On développe les acides gras di-hydroxylés restant à l'origine de la plaque dans la seconde dimension perpendiculairement à la première à l'aide d'un mélange solvant hexane/diéthyl-éther/acide acétique glacial en proportion volumique 25/74/1. Leur détection, récolte, extraction, séparation et analyse quantitative s'effectue comme indiqué en 1.2 ci-dessus, sauf que le mélange solvant d'élution dans l'HPLC est méthanol/acide acétique aqueux de pH3 en proportion volumique 66/34. On utilise PGB2 comme standard d'évaluation quantitative des acides gras di-hydroxylés selon leur absorbance UV maximale respective (longueur d'onde 270 nm, extinction $2,8 \times 10^4$ et $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour PGB₂ et respectivement di-hydroxy dérivés).

2. Résultats

L'acide arachidonique (AA) (Sigma Chemical Company, St.Louis MO, USA) est utilisé comme contrôle, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'incubation des leucocytes avec d'autres acides gras.

Les acides gras incubés avec les leucocytes sont: l'acide stéaridonique (SA) obtenu à partir de l'huile de pépins de cassis, sous forme purifiée selon la demande de brevet CH 1919/89-9 (EP.A...), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (Sigma Chemical Company) et l'acide di-homogammalinolénique (DHLLA) (Sigma Chemical Company).

l'acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque (5-HETE) (Cayman Chemical, Ann Arbor Mi, USA), longueur d'onde maximum (λ max):234 nm, temps de rétention (Rt):42,69 min,

l'acide 5S,12S[E,Z,E,Z]-di-hydroxyeicosatétraénoïque (di-HETE) (M. Guichardant et al, biochem. J.256,879-883, 1988), λ max:259, 268 et 279 nm, Rt: 29,96,

l'acide 5S,12 R [Z,E,E,Z]-5,12-hydroxy-6,14-cis-8,10-trans-eicosatétraénoïque (LTB4) (Cayman Chemical), λ max:261, 271 et 282 nm, Rt: 27,46 min,

l'isomère A de LTB4, 5S,12R [E,E,E,Z]-LTB4 (M.Guichardant et al, biochem. s.256,879-883,1988), Rt:21,46 et

l'isomère B de LTB4, 5S,12 S[E,E,E,Z]-LTB4 (M.Guichardant et al, biochem. s.256,879-883,1988), Rt:24,27.

Les quantités de métabolites obtenues sont exprimées en picomole/ 10^8 leucocytes et représentent la moyenne de 5 expériences avec n déterminations. Les degrés de signification, P, sont déterminés par un test t par rapport au contrôle.

Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-après:

TABLEAU

Acide gras incubé avec les leucocytes, stimulés par AA μ M	Quantité d'acide gras incubé, μ M	n	Quantité de métabolites, picomole / 10^8 leucocytes				
			5-HETE	LTB4	LTB4 isomère A	LTB4 isomère B	DI-HETE
SA	10	4	8880	10220	2670	2780	700
			--	P<0,02	--	--	--
SA	20	6	7030	8480	2070	2200	510
			P<0,05	P<0,01	P<0,01	P<0,05	--
EPA	20	4	5920	9090	2180	2730	510
			P<0,01	P<0,01	P<0,05	--	--
DHLLA	20	3	5350	3140	770	780	168
			P<0,01	P<0,01	P<0,02	P<0,05	P<0,01
Contrôle	0	6	9080	17770	4080	4190	720

Légende: --: non significatif

Les résultats précédents montrent clairement que le SA, acide gras polyinsaturé de la série n-3 a un

effet sur le métabolisme de l'AA conduisant aux leucotriènes par l'intermédiaire de la 5-lipoxygénase des leucocytes humains. Il diminue la formation des 5-HETE et DI-HETE d'environ 25% et celle des leucotriènes B4 d'environ 50%, c'est-à-dire de manière comparable à l'EPA qui est également un acide gras polyinsaturé de la série n-3 à concentration égale (20 μ M).

- 5 Son activité est cependant moins forte que celle de l'acide di-homogammalinolénique, acide gras polyinsaturé de la série n-6 qui inhibe la formation des leucotriènes B4 à environ 80% et celle du 5-HETE à environ 40% à la même concentration (20 μ M).

Son effet pourrait aussi être dû à certains de ses métabolites hydroxylés qui ont été détectés à partir du SA marqué.

10

Exemple 2-5

2. On prépare des capsules de gélatine pour l'administration orale contenant 250 mg de SA obtenu à partir de l'huile de pépins de cassis.
- 15 3. On prépare des capsules de gélatine pour l'administration orale contenant 250 mg de SA obtenu à partir de l'huile de poisson.
4. On prépare des capsules de gélatine pour l'administration orale contenant 500 mg d'un mélange d'acides gras contenant 80% de GLA et 15% de SA obtenu à partir de l'huile de pépins de cassis.
- 20 5. On prépare des capsules de gélatine pour l'administration orale contenant 500 mg d'un mélange d'acides gras contenant 16% de SA, 35% d'EPA et 39% de DHA à partir de l'huile de poisson.

Exemples 6-9

On prépare les compositions suivantes destinées à une application topique:

25

6. <u>Onguent hydrophobe</u>	<u>%</u>
SA	5
Polyéthylène micronisé	10
Myristate d'isopropyle	85

35

40

45

50

55

7. Pommade hydrophobe%

5	SA	1
	Triglycérides des acides caprique, caprylique et stéarique	40
10	Triglycérides des acides caprique et caprylique	30
	Vaseline	20
	Huile de vaseline	9

8. Crème%

20	SA	0,5
	Alcool cétylique	6
	Alcool cétylique oxyéthyléné à 20 moles d'oxyde d'éthylène monostéarate de glycérol	
25	Triglycérides des acides caprique et caprylique	15
	Propylèneglycol	10
30	Eau	68,5

9. Lotion%

35	SA	0,1
	Ethanol	50
40	Propylèneglycol	49,9

Les compositions des exemples 6 à 9 précédents sont fabriquées et entreposées en atmosphère inerte et à l'abri de la lumière.

45 **Revendications**

1. Utilisation de l'acide stéaridonique ou de l'un de ses dérivés pharmaceutiquement acceptable pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention et au traitement des maladies d'origine inflammatoire chez les mammifères.
2. Utilisation selon la revendication 1, en combinaison avec un ou des acide(s) gras polyinsaturé(s) inhibiteur(s) du métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique ou un ou des dérivé(s) pharmaceutiquement acceptable(s) d'un ou de tel(s) acide(s).
3. Utilisation selon la revendication 2, en combinaison avec l'acide eicosapentaénoïque et/ou docosa-hexaénoïque.
4. Utilisation selon la revendication 2, en combinaison avec l'acide gamma-linolénique et/ou di-homogam-

malinolénique.

5. Utilisation selon la revendication 2 sous forme d'un concentrat provenant de l'enrichissement de l'huile de pépins de cassis ou de l'huile de poisson.
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5 sous une forme adaptée à l'administration par voie orale, rectale, entérale ou parentérale.
7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5 sous une forme adaptée à l'administration topique.
8. Utilisation selon la revendication 1 sous une forme fournissant une dose quotidienne de 0,05 à 10 g d'acide stéaridonique ou de l'un de ses dérivés pharmaceutiquement acceptable.
9. Procédé de prévention et de traitement des maladies d'origine inflammatoire chez les mammifères, caractérisé par le fait que l'on administre aux patients une quantité efficace d'acide stéaridonique ou de l'un de ses dérivés pharmaceutiquement acceptable, le cas échéant en combinaison avec un ou des acide(s) gras polyinsaturé(s) inhibiteur(s) du métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique ou un ou des dérivé(s) pharmaceutiquement acceptable(s) d'un ou de tel(s) acide(s).
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par le fait que l'on administre aux patients une dose quotidienne de 0,05 à 10 g d'acide stéaridonique ou de l'un de ses dérivés pharmaceutiquement acceptable.



Office européen
des brevets

**RAPPORT PARTIEL
DE RECHERCHE EUROPEENNE**

qui selon la règle 45 de la Convention sur le brevet
européen est considéré, aux fins de la procédure ultérieure,
comme le rapport de recherche européenne

Numéro de la demande

EP 90 10 9883

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
X	LIPIDS, vol. 24, no. 12, décembre 1989, pages 1004-1007; V. KOCKMANN et al.: "Inhibitory effect of stearidonic acid (18:4 n-3) on platelet aggregation and arachidonate oxygenation"		A 61 K 31/20
	* En entier *	1	
Y	--	2-4	
X	EP-A-0 347 056 (EFAMOL) * Résumé; page 4, ligne 33 - page 5, ligne 35; exemples; revendications *	1-8	
	--		
Y	INT. ARCHS ALLERGY APPL. IMMUN., vol. 34, novembre 1987, pages 233-240; ./.		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)
			A 61 K
RECHERCHE INCOMPLETE			
<p>La division de la recherche estime que la présente demande de brevet européen n'est pas conforme aux dispositions de la Convention sur le brevet européen au point qu'une recherche significative sur l'état de la technique ne peut être effectuée au regard d'une partie des revendications.</p> <p>Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes: 1-8 Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes: 9,10 Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches: 9,10 Raison pour la limitation de la recherche:</p> <p>Méthode de traitement chirurgical ou thérapeutique du corps humain ou animal (voir art. 52(4) de la convention sur le brevet européen)</p>			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 27-12-1990	Examineur GOETZ
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	



Office européen
des brevets

**RAPPORT PARTIEL
DE RECHERCHE EUROPEENNE**

Numéro de la demande

EP 90 10 9883

-2-

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
	S. YOSHINO et al.: "Effect of a fish-oil-supplemented diet on inflammation and immunological processes in rats"		
	* En entier *	2,3, 5-8	
	--		
Y	PROSTAGLANDINS, vol. 28, no. 5, novembre 1984, page 668; T. TERANO et al.: "Biosynthesis and biological activity of LTB ₅ "		
	* En entier *	2,3, 5-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)
	--		
Y	ALLERGIE ET IMMUNOLOGIE, vol. 19, no. 8, octobre 1987, pages 12-13; J.L. ROBIN: "Intérêt potentiel de l'acide eicosapentaénoïque"		
	* En entier *	2,3, 5-8	
	--		
D,Y	J. RHENMATOL, vol. 16, 1989, pages 729-733; G. TATE et al.: "Suppression of acute and chronic inflammation by dietary gamma linolenic acid"		
	* En entier *	2,4-8	
	--		
Y	EP-A-0 087 865 (EFAMOL)		
	* Résumé; page 11, ligne 16 - page 13, ligne 23; exemples; revendications *	2,4-8	
	--		
Y	EP-A-0 068 854 (D. HORROBIN)		
	* Résumé; page 2, lignes 12-22; ./.	2,4-8	



Office européen
des brevets

**RAPPORT PARTIEL
DE RECHERCHE EUROPEENNE**

Numéro de la demande

EP 90 10 9883

-3-

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendica- tion concernée	
	page 3, ligne 35 - page 5, ligne 24; exemples; revendications *		
	--		
Y	GB-A-2 204 239 (SCRAS) * Résumé; revendications *	3,7	
	--		
Y	EP-A-0 295 954 (BLOCK DRUG CO. INC.) * Revendications *	2,3, 5-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)
	--		
Y	EP-A-0 302 482 (CENTURY LABORATO- RIES) * Résumé; revendications *	2,3, 5-8	
